(2) 測定精度等

河川水試料中の PCB 濃度について、低濃度測定*のために 1,000 倍濃縮試料による測定を行った。

* 昭和 46 年 12 月 28 日付 環告 59 号「水質汚濁に関する環境基準について」中の、「人の健康の保護に関する環境基準」で定める、PCB の環境基準値では「検出されないこと」(定められた測定方法の定量限界を下回ることであり 0.0005mg/L 未満)とされている。

① 検量線作成記録

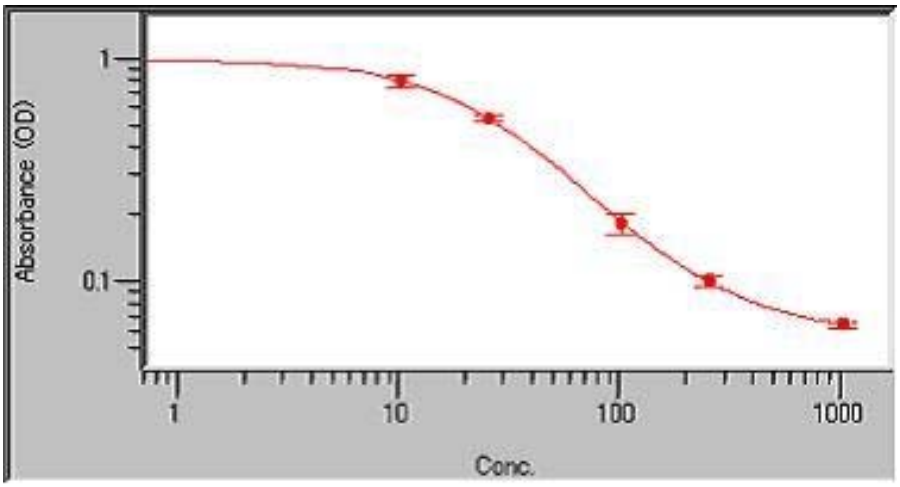
表 5.2.4 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液					
			溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5
所定濃度		μg/L	0	10	25	100	250	1,000
実測回数		回	3					
ELISA 実測 (吸光度)	1	－	0.997	0.883	0.568	0.206	0.111	0.070
	2	－	1.082	0.785	0.563	0.202	0.109	0.068
	3	－	1.060	0.842	0.588	0.168	0.100	0.065

表 5.2.5　**採用した回帰式係数**[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.05	1.39	26.1	0.0627

Abs = (1.05 - 0.0627) / (1 + (Conc / 26.1)^1.39) + 0.0627



② 試験結果記録

表 5.2.6 河川水試料測定データ

項目		単位	河川水		
			千種川 坂越橋	猪名川 利倉橋	左門殿川 辰巳橋
前処理での濃縮倍率		倍	1,000		
実測回数		回	3		
ELISA 実測 (吸光度)	1	―	1.035	0.984	1.018
	2	―	1.048	0.989	0.965
	3	―	1.067	1.017	1.032
	平均	―	1.050	0.997	1.005
変動係数		%	1.5	1.8	3.5
ELISA 測定濃度 (換算値*) (PCB#118)	1	μg/L	0.0010	0.0037	0.0020
	2		N.D.	0.0035	0.0046
	3		N.D.	0.0021	0.0012
	平均		―	0.0031	0.0026
判定値			<0.011	<0.011	<0.011
変動係数		%	―	28.4	67.0
ELISA 測定濃度 (換算値*) (KC-500 当量)	1	μg/L	0.011	0.041	0.023
	2		N.D.**	0.038	0.050
	3		N.D.**	0.023	0.014
	平均		―	0.034	0.029
判定値			<0.12	<0.12	<0.12
GC/MS 測定濃度	PCB#118	pg/L	3.5	4.9	54.0
	Total PCB	μg/L	0.0002	0.0013	0.015
	PCB #118 / Total PCB	―	57.1	265.3	277.8

* 換算値は試料当量で算出した。

** N.D. (Not Determine) 吸光値が測定範囲以上で濃度が出なかったもの。

ELISA の検出下限は 3.5μg/L，定量下限は 11.5μg/L（DMSO 置換と共に 1,000 倍の濃縮を行った。）

GC/MS の検出下限は 0.01 ng/L，定量下限は 0.03 ng/L

6　実証試験結果の検討と考察

(1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能７項目の全ての結果から、10～250μｇ/L の濃度範囲においては、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

一般の河川水中 PCB 濃度は低値であることから、適切な前処理を行えば実用化が可能である。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理時間を除いて、2 時間で測定結果が得られた。また、同時に約 25 試料（3 重測定）の測定が可能である。

なお、本試験での GC/MS 測定では、3 試料（3 重測定）の測定に約３日が必要である。

計 画 書

環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験計画書

環境技術開発者	株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ
技術・製品の名称	技術：ELISA法（酵素免疫測定法） 製品の名称：PCB EIA System

平成16年11月29日

兵　庫　県

はじめに

本実証試験計画書は，「化学物質に関する簡易モニタリング技術　実証試験要領（平成 16 年 8 月 31 日　環境省総合環境政策局）」（以下，「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について，実証機関および環境技術開発者の 2 者が協議，合意の上，実証試験要領に準じて策定したものである。

（実証機関）

兵庫県立健康環境科学研究センター

所長　吉村　幸男　　印

（環境技術開発者）

株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ

代表取締役　水上　春樹　　印

目　次

1. 実証試験の概要と目的..... 1
1.1 実証試験の概要と目的..... 1
1.2 実証試験の種類..... 1
2. 実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌..... 2
2.1 実証試験の参加組織..... 2
2.2 実施体制..... 2
2.3 実証試験参加者の責任分掌..... 3
3. 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要..... 4
3.1 実証対象製品の原理..... 4
3.2 実証対象製品のデータ..... 4
4. 実証試験のデザイン..... 6
4.1 実証試験の期間..... 6
4.2 実証試験の内容..... 7
4.3 実証対象製品の受け入れと管理..... 8
4.4 実証試験の方法..... 10
（1）基本的な性能試験..... 11
①測定範囲試験..... 11
②検出下限および定量下限試験..... 11
③繰返し再現性試験..... 12
④日間再現性試験..... 12
⑤期間再現性試験..... 12
⑥プレート間再現性試験..... 12
⑦交差反応性試験..... 12
（2）実用的な性能試験..... 13
①回収特性試験..... 13
②測定精度試験..... 13
5. データの品質管理..... 14
6. データの管理，分析，表示..... 14
6.1 データ管理とその方法..... 14
6.2 データ分析と表示..... 14

7. 評価..... 14

付録 1：取扱説明書
付録 2：自社による性能試験結果
付録 3：参考となるその他の文書やデータ

1. 実証試験の概要と目的

1.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら，環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について，その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより，環境技術実証の手法･体制の確立を図るとともに，環境技術の普及を促進し，環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は，平成 16 年 8 月 31 日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領に基づいて選定された実証対象技術について，同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで，製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは，操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので，スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は，一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に，以上の条件に該当するものとして，抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ELISA 法）による簡易分析技術とする。

ここでは，対象とする化学物質から，環境省で別途検討が進められているダイオキシン類を除外するものとする。

1.2 実証試験の種類

本実証試験では，以下の視点から実証を行うものとする。

- 製品性能の信頼性
- 一般環境モニタリングでの実用性
- 製品操作等の簡便性

2．実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は，下表に示すとおりである。

表1　実証試験参加組織

実証機関	団体名	兵庫県立健康環境科学研究センター
	住所	〒654-0037　神戸市須磨区行平町 3-1-27
	担当者所属・氏名	安全科学部　主任研究員　古武家善成
	電話番号	078-735-6911
	FAX 番号	078-735-7817
	E-mail アドレス	Yoshinari_kobuke@pref.hyogo.jp
環境技術開発者	企業名	株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ
	住所	〒135-8073 東京都江東区青梅 2-45 タイム 24 ビル 4F
	担当者所属・氏名	開発本部　奥山　亮
	電話番号	03-5531-5235
	FAX 番号	03-5531-5236
	E-mail アドレス	okuyama@enbiotec.co.jp

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は，下図に示すとおりである。

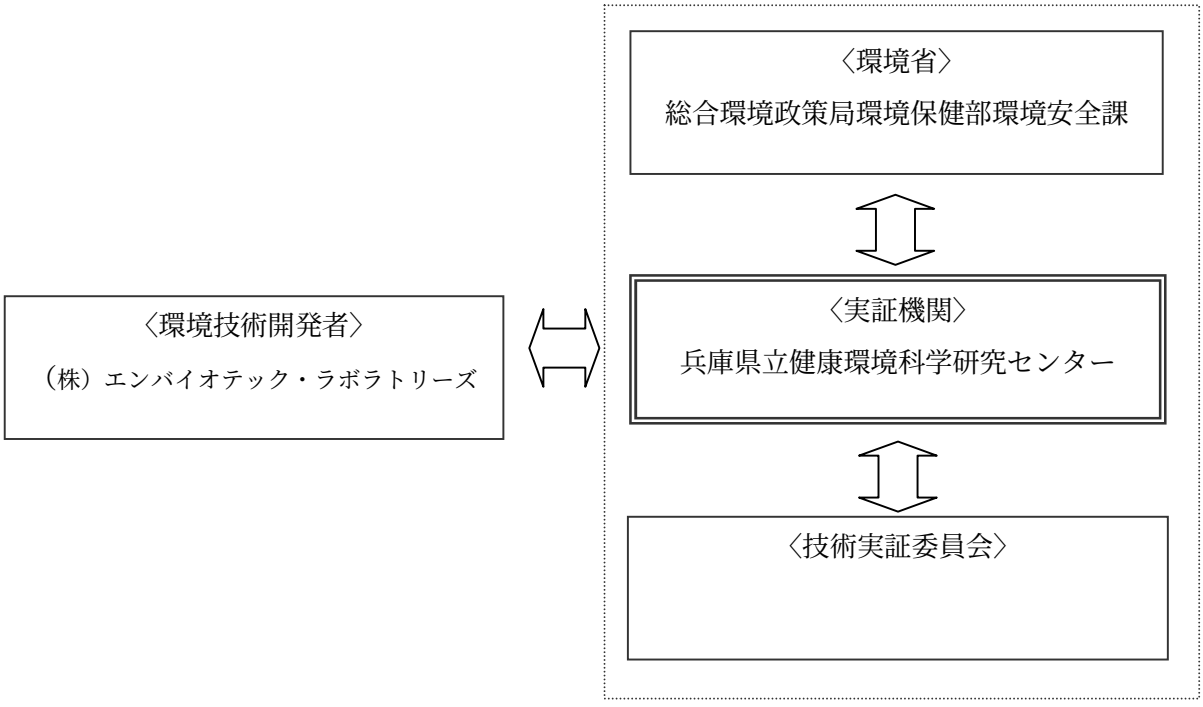


図 1　実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は，下表に示すとおりである。

表2　実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の総括責任者	安全科学部長	吉岡　昌徳
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	主任研究員	古武家　善成
	実証試験における ELISA 法担当者	研究員	北本　寛明
	実証試験における機器分析の総括責任者	研究主幹	中野　武
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	古武家　善成
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	藤森　一男
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	松村　千里
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	吉田　光方子
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	鶴川　正寛
	実証試験における品質管理・内監の総括責任者	企画情報部長	辻　正彦
	実証試験における品質管理・内監担当者	主任研究員	池沢　正
	実証試験における品質管理・内監担当者	課長補佐	喜多　博子
	実証試験における品質管理・内監担当者	主任研究員	岡田　泰史
環境技術開発者	実証対象製品の提供	開発本部	奥山　亮
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	開発本部	奥山　亮
	実証試験実施上の参考情報の提供	開発本部	奥山　亮

3．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は，申請者が開発した PCB#118 に対する特異的なモノクローナル抗体を応用した，環境中（対象環境媒体：土壌，生物）の PCB 測定 ELISA キットである。

この ELISA キットの反応原理は競合反応（PCB 濃度が高い試料では吸光度が低く，PCB 濃度が低い試料では吸光度が高い）で，マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは，下表に示すとおりである。

表 3-1　**実証対象製品のデータ** 1

項目	記　入　欄
製品名	PCB EIA System
型番	RPN5949
販売・製造元	販売：アマシャムバイオサイエンス（株） 製造：（株）エンバイオテック・ラボラトリーズ
重量（キット一式，g）	約 500g
価格（円）	98,000 円
分析対象物質	PCB
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（土壌）
利用用途	食品・土壌中の PCB スクリーニング
標準試薬・種類	4-methoxy-3,3',4-trichlorobiphenyl 付属（調整済／調整要）
操作環境（室温）	15℃～35℃（室温）
製品保管条件	2～8℃（冷蔵保存）
製品保証期間	製造後 6 ヶ月間
同時測定数（最多）	42 試料（2 重測定）
測定時間	1.5 時間（前処理時間除く）

表 3-2　実証対象製品のデータ 2

項目	記　入　欄
1. 基本的な性能	
①測定範囲	6.5～250μg/L（最終 DMSO 検液中の PCB118 濃度として） （添付資料：付録 2）
②検出下限および定量下限	検出下限：6.5μg/L　　定量下限：6.5μg/L
③繰返し再現性	標準偏差：1.7～5.0，変動係数：2.1～8.9% （同一ロットのキットを用いて，n=8 にて 3 濃度の試料測定）
④日間再現性	標準偏差：2.9～9.7，変動係数：11.6～16.5% （同一ロットのキットを用いて，6 日間 3 濃度の試料測定）
⑤期間再現性	標準偏差：3.2～10.7，変動係数：10.6～12.5% （同一ロットのキットを用いて，製造より 0 ヶ月，3 ヶ月，6 ヶ月後に 2 濃度の試料測定）
⑥プレート間再現性	標準偏差：1.9～3.6，変動係数：7.2～9.1% （同一ロットのキットを用いて，2 濃度の試料測定）
⑦交差反応性	交差率：0.88～15.2%（PCB #28, #31, #33, #66, #70, #105, #110）
⑧その他	
2. 実用的な性能	
①回収特性	前処理後試料における添加回収試験にて 78.4～112%の回収率 （魚試料）
②測定精度等	機器分析との相関： 生物（魚）試料 R^2=0.96, n=20 土壌試料　＜高濃度試料＞R^2=0.99, ＜低濃度試料＞R^2=0.94
③その他	
試験責任者	奥山　亮
試験年月日	平成 14 年～平成 16 年 7 月 30 日

以下の項目については，付録 1～3 に添付する。

- 取扱説明書（付録 1）
- 自社による性能試験結果（付録 2）
- 参考となるその他の文書やデータ等（付録 3）

4．実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は，平成 17 年 1 月とする。また，その期間のスケジュールは下表に示すとおりである。

表 4　実証試験のスケジュール（予定）

	11 月	1 月			
	4-5 週	2 週	3 週	4 週	5 週
実証試験計画の策定					
対象技術の選定，計画書案作成	○				
実証試験計画書策定，承認	○				
実証試験の実施					
測定範囲の検討			○		
検出限界および定量限界の検討			○		
繰返し再現性の検討			○		
日間再現性の検討			○		
期間再現性の検討			○		
プレート間再現性の検討			○		
交差反応性の検討				○	
回収特性の検討				○	○
測定精度の検討				○	○
内部監査の実施					○
実証試験結果中間報告		○			
技術実証委員会の実施	○	○			

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は，表 5 のとおりである。

表 5 実証項目の内容

項目	内容
1．基本的な性能	
①測定範囲	市販標準物質で調製した指定濃度系列について，繰返し操作により平均値，変動等を求め，提出された測定範囲の妥当性を検討する。
②検出下限および定量下限	市販標準物質で調製した指定濃度系列の下限付近の濃度について，繰返し操作による標準偏差から検出下限および定量下限を求め，提出された下限値の妥当性を検討する。
③繰返し再現性	市販標準物質で調製した指定濃度系列の中央付近の濃度について，繰返し操作により平均値，変動等を求め，再現性を検討する。
④日間再現性	市販標準物質で調製した指定濃度系列について，異なる日に，繰返し操作により平均値，変動等を求め，再現性を検討する。
⑤期間再現性	市販標準物質で調製した指定濃度系列について，一定期間前後で，繰返し操作により平均値，変動等を求め，再現性を検討する。
⑥プレート間再現性	市販標準物質で調製した指定濃度系列について，異なるロットや異なるプレートで，繰返し操作により平均値，変動等を求め，再現性を検討する。
⑦交差反応性	市販標準物質および類似物質で調製した指定濃度系列について，吸光度曲線を求め，交差反応性を検討する。
2．実用的な性能	
①回収特性	市販標準物質で調製した指定濃度系列の中央付近の濃度について，環境試料を用いた回収試験を行い，回収特性を検討する。
②測定精度	濃度未知の環境試料を ELISA キットおよび機器分析法で測定し，結果の比較から，測定精度や環境試料への適用可能性を検討する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

（1）実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

ELISA キット受領時の状態について，搬入者の立ち会いの元に，受領の記録を ELISA キット管理表（様式 1）に記入し，以下の事項を確認する。

- 管理表と ELISA キットの品名，数量が一致していること。
- ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。
- ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは，搬入者と協議し適切な処置をとる。

（2）ELISA キットの管理

- ELISA キットは，変質しないように，取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。
- ELISA キットの分轄を行う場合は，汚染や品質低下のない方法で行い，識別番号等必要な表示を行うとともに，分轄の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA **キット管理表（様式** 1**）**

受領年月日　　年　　月　　日　　時　　分　　搬入者＿＿＿＿＿＿

番号（管理番号）　　－＿＿＿＿

メーカー名＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

品名＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

搬入時確認事項

□　包装等に破損がない　　保管場所＿＿＿＿＿＿

□　保管温度（　　℃）　　保管温度　　℃

□　搬入時の温度管理

□　使用期限

□　その他異常なし

受領者＿＿＿＿＿＿

（移動・分轄等の記録）

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験および実用的な性能試験において，以下の操作は共通である。

a. 製品の操作

製品の操作にあたっては，製品の取扱説明書を遵守するとともに，「化学物質簡易モニタリング実証試験　品質管理マニュアル」（付録 4）の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

b. 検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属する標準物質を用い，キットが指定する希釈濃度系列（以下，指定濃度系列）を作成する。

c. 吸光度の測定

指定濃度系列および各試験用試料溶液の吸光度は，マイクロプレートリーダー（バイオ・ラド社マイクロプレートリーダー　モデル 680）で測定する。

d. 検量線の作成

プレート毎に同時に測定したブランク（添付の希釈液等）および標準溶液指定濃度系列の吸光度（3 重測定の平均値）から，キットの指示に従い検量線を作成する。

e. 実測濃度の算出

d.で作成した検量線を用いて，各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

（1）基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため，製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品（以下，市販標準物質）で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

- 試験用試料溶液の調製

市販標準物質 PCB #118（ACCU Standard 社製 2,3',4,4',5-PeCB）を用いて，DMSO を希釈溶媒として，試験用試料溶液を作成する。

標準溶液指定濃度系列および試験用試料溶液の調製濃度は，表 6 のとおりである。

表 6　標準溶液指定系列および試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料名試料溶液調製濃度（μg/L）
標準溶液指定濃度系列	キット付属 PCB #118 擬似標準品	0，10，25，100，250，1000
①測定範囲 ④日間再現性 ⑤期間再現性 ⑥プレート間再現性	PCB #118	0，10，25，100，250，1000
②検出下限および定量下限	PCB #118	10
③繰返し再現性	PCB #118	25
⑦交差反応性	PCB #77 PCB #105 2,2',4,4',5,5'-HeBB	0，10，25，100，250，1000 0，10，25，100，250，1000 0，10，25，100，250，1000

①　測定範囲

市販標準物質で調製した指定濃度系列の試料溶液について，各調製濃度につき 3 重測定を行い，3 個の吸光度それぞれから求めた測定濃度より，平均値，標準偏差，変動係数を求める。

これを基に，調製濃度と実測濃度との比較，指定された測定範囲の妥当性について検討する。

②　検出下限および定量下限試験

市販標準物質で調製した指定濃度系列の下限付近の 1 濃度を 8 回測定し，3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の測定濃度より標準偏差（SD）を求める。求めた SD から得られ 3SD および 10SD をそれぞれ検出下限および定量下限とし，申請データと比較検討する。

③　繰返し再現性試験

市販標準物質で調製した指定濃度系列の中央付近の 1 濃度を 3 重測定で 8 回測定し，3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の測定濃度より平均値，標準偏差，変動係数を求める。

求めた変動係数から，繰返し再現性について製品仕様の妥当性を検討する。

④　日間再現性試験

（同一測定者が）1 週間の異なる 3 日間において，同一ロットの異なるプレートを用いて「①測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた平均値，標準偏差，変動係数をプレート毎に求め，3 日間の結果の比較から製品仕様の妥当性を検討する。

⑤　期間再現性試験

1 ヶ月以上離れた製造年月日の 2 枚のプレートを用いて，同時に（同日に）「①測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた各プレートの測定濃度の平均値，標準偏差，変動係数を求め，その結果の比較から製品仕様の期間再現性の妥当性を検討する。

⑥　プレート間再現性試験

同一ロット 2 プレートおよび異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて，（同一測定者が）同時に（同日に）「①測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた 3 プレート間の平均値，標準偏差，変動係数の比較から，同一ロットおよび異なるロットでのプレート間再現性について製品仕様の妥当性を検討する。

⑦　交差反応性試験

市販標準物質および類似物質を用いて，指定濃度系列で吸光度曲線（吸光度は 3 重測定の平均値から求める）を描き，吸光度曲線から類似物質の 50%発色阻害濃度を求める。（市販標準物質の 50%阻害濃度/類似物質の 50%阻害濃度）×100（%）で交差率を求め，類似物質の交差反応性を検討する。

類似物質に関して，指定濃度系列のみでは 50%発色阻害濃度が求められない場合は，50%発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り，試験をやり直す。予想される高濃度側の濃度範囲が実用的でない場合には，20 または 10%阻害濃度で代用する。

（類似物質の交差反応性に関しては，申請者の交差反応性に関するデータを参考とする。）

（2）実用的な性能試験

実証対象製品の実用的な性能を検討するため，環境試料への適用性等の観点から環境試料試験による実証試験を行う。

① 回収特性試験

グラスファイバーフィルター(孔径 1μm に準拠)を用いて, 河川水をろ過したろ液を原水とし，それに指定濃度範囲の中央付近の 1 濃度となるように市販標準物質を添加するとともに，妨害物質として標準フミン酸を一定濃度添加して，試験用試料溶液を調整する。試験用試料溶液の調製濃度は，表 7 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について，3 重測定して平均値，標準偏差，変動係数，回収率を求め，フミン酸存在下での製品の回収特性を検討する。

表 7　試験用試料溶液

物質名	試料名および調製濃度（mg/L）
分析対象物質：PCB	0.025
妨害物質：フミン酸ナトリウム	1 5 10 50

② 測定精度試験

複数（3 地点）の河川地点から得られた河川水について,「別添　前処理法」に示す方法で処理し PCB を測定する。

同一試料について，所定のマニュアル（前処理法を含む）に従って機器分析を行い，ELISA と機器分析の実測値を比較し（相関係数および回帰式），検討する。

また，操作簡便性（測定時間，操作ステップ数，標準溶液・反応液の調製の難易）について，環境試料への適用性の観点から検討する。

5．データの品質管理

（1）測定操作の記録

a．実証試験過程で入手，作成した文書（デジタル画像を含む）および記録については適切に管理・保管する。

b．実証項目の試験は，「品質管理マニュアル」（付録 4）に従って行い，その分析作業台帳および分析機器の点検事項等は，記録に残す。

（2）データ処理の管理

a．試験データの計算や転記について，当該実施者以外の監督者によるチェックを行い，記録を残す。

b．試験データのファイルはコンピュータと独立したメモリーチップに保存し，関係のない者がデータファイルにアクセスできないようにする。

c．データファイルの紛失の可能性があるときは，バックアップを取りデータを保護する。

6．データの管理，分析，表示

6.1 データ管理

本実証試験から得られる以下のデータは，「化学物質簡易モニタリング実証試験　品質管理マニュアル」に従って管理するものとする。

6.2 データ分析と表示

本実証試験で得られたデータについては，必要に応じ統計分析の処理を実施するとともに，使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

7．評価

本実証試験で得られたデータの品質監査は，「化学物質簡易モニタリング実証試験　品質管理マニュアル」（別資料）に従って行うものとする。

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に内部監査を実施し，兵庫県立健康環境科学研究センター所長に報告する。

河川水試料の前処理法

河川水試料 1L を最終的に DMSO(ジメチルスルホキシド) 1mL に転溶し、PCB EIA System に用いるために、以下の方法により河川水からの PCB 抽出を行なう。

<機器・試薬等>

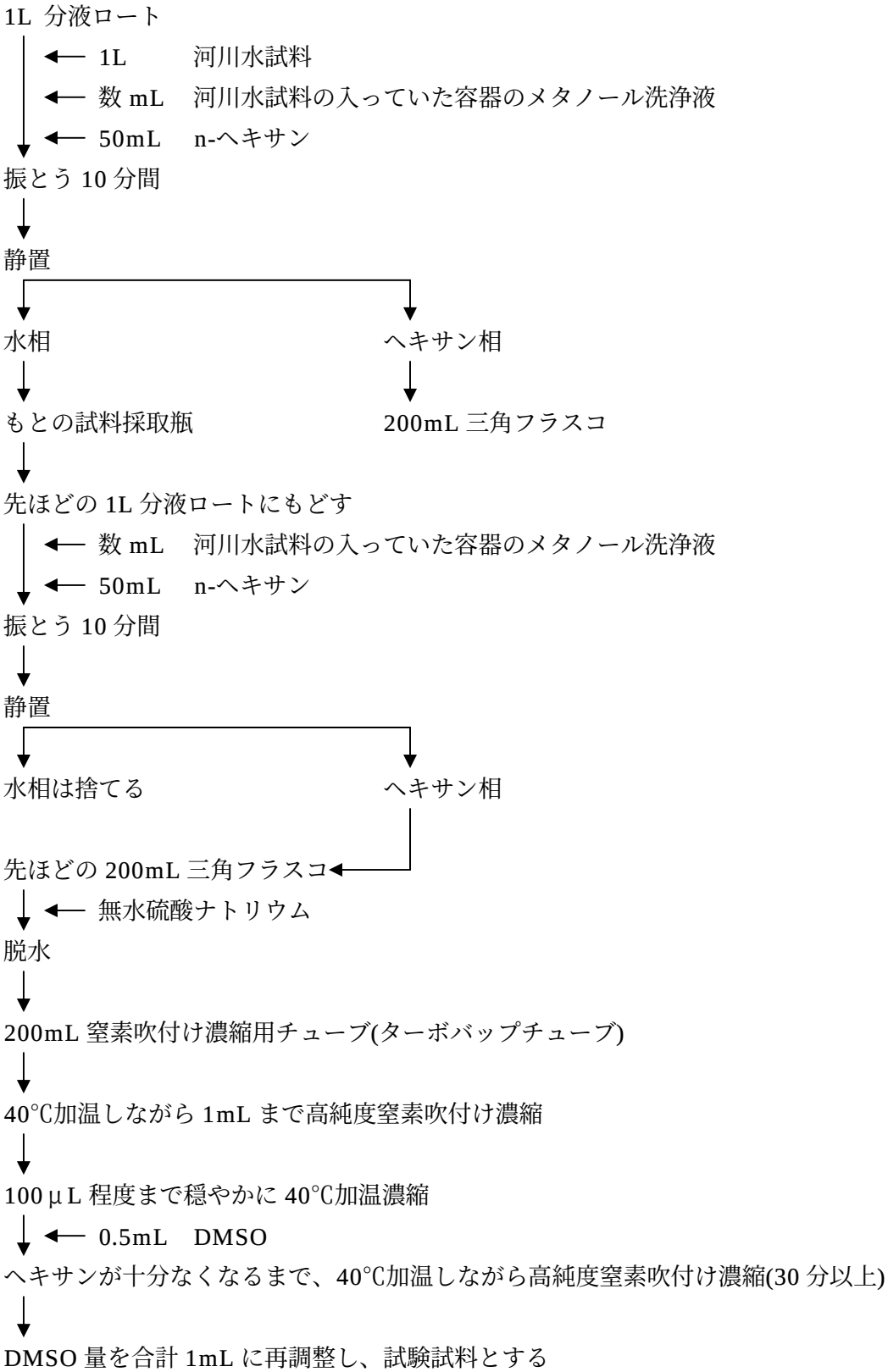
高温槽付窒素吹付け濃縮器：Turbo VapⅡ　(Zymark 社)
1L 分液ロート
専用濃縮用チューブ
200mL 三角フラスコ
ガラスロート
濾紙：5A 125mm (ADVANTEC 社)
n-ヘキサン(残留農薬・PCB 試験用以上)
メタノール(残留農薬・PCB 試験用以上)
DMSO(ジメチルスルホキシド)(生化学用)
硫酸ナトリウム(農薬分析用以上)
高純度窒素ガス

<方法>

河川水 1L を 50mL n-ヘキサンを加えて振とう抽出を 2 回行なう。このとき、河川水試料の入っていた容器は、メタノール数 mL で洗浄し、その洗浄液も試料水と合わせて抽出する。抽出後のヘキサン溶液は、無水硫酸ナトリウムで脱水後、40℃恒温水槽内で高純度窒素ガス吹付けにより、1mL まで濃縮する。さらに、40℃加熱のみでごく微量まで濃縮後、DMSO 0.5mL を濃縮用のチューブ壁下部を洗うように添加し、再び 40℃恒温水槽内で高純度窒素ガス吹付けを行い、ヘキサンを十分に除去する。ヘキサン液の濃縮時に乾固させないように注意する。

この後、DMSO を添加して 1mL とし、EIA 反応用試料とする。

<前処理の流れ>


1L 分液ロート
← 1L　河川水試料
← 数 mL　河川水試料の入っていた容器のメタノール洗浄液
← 50mL　n-ヘキサン
振とう 10 分間
静置
水相
ヘキサン相
もとの試料採取瓶
200mL 三角フラスコ
先ほどの 1L 分液ロートにもどす
← 数 mL　河川水試料の入っていた容器のメタノール洗浄液
← 50mL　n-ヘキサン
振とう 10 分間
静置
水相は捨てる
ヘキサン相
先ほどの 200mL 三角フラスコ
← 無水硫酸ナトリウム
脱水
200mL 窒素吹付け濃縮用チューブ(ターボバップチューブ)
40℃加温しながら 1mL まで高純度窒素吹付け濃縮
100μL 程度まで穏やかに 40℃加温濃縮
← 0.5mL　DMSO
ヘキサンが十分なくなるまで、40℃加温しながら高純度窒素吹付け濃縮(30 分以上)
DMSO 量を合計 1mL に再調整し、試験試料とする

EnBio PCB EIA system

EnBio PCB EIA system

Code RPNJ412

96 wells

STORAGE:

Store at 2~8℃

EXPIRY:

The expiry date is stated on the package and will be at least 4 weeks from the date of dispatch.

Warning

For research use only. Not recommended or intended for diagnosis of disease in humans or animals. Do not use internally or externally in humans or animals.

製品の仕様はやむを得ず変更される場合がありますので、あらかじめご了承ください。

Amersham Biosciences

目次　　ページ

1．　はじめに……2

2．　キットの特長……2

3．　測定原理（競合 EIA 法）……2

4．　アッセイシステムの内容……3

5．　キット使用上の注意……3

6．　アッセイ方法……4

(1)　必要な器具および試薬……4
(2)　標準液の調整……4
(3)　HRP 標識競合体溶液の調整……5
(4)　混合液（標準液と HRP 標識競合体溶液）の調整……5
(5)　Wash buffer の調整……5
(6)　測定操作手順……6

7．　測定値の算出法……6

(1)　算出例……6
(2)　総 PCB 濃度の推定……7

8．　土壌試料への適用……7

(1)　試料前処理例……7
(2)　適用例：GC-ECD との相関性……8

9．　廃油（絶縁油）試料への適用……8

(1)　試料前処理例……8
(2)　適用例……9

10．　システムの性能……10

(1)　交差反応性……10
(2)　標準品……11
(3)　測定感度……11
(4)　再現性……11
(5)　Precision profile……12

11．　トラブルシューティングガイド……13

(1)　吸光度が低すぎる……13
(2)　吸光度が高すぎる/zero standard 値が高すぎる……13
(3)　測定の精度、再現性が良くない……13

1. はじめに

本キットでは、PCB の異性体の一つである、PCB #118 に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を用いています。PCB #118 は、PCB 製品であるカネクロル等の主要異性体の 1 種であることから、本キットを用いて PCB の総濃度を推定することが出来ます。

2. キットの特長

- PCB #118 に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を利用しているため、試料中の PCB を特異的に検出・測定することが出来ます。
- 本キットには PCB #118 と同等の反応性を示す擬似標準品（3,3',4'-trichloro-4-methoxy-biphenyl）を添付しており、PCB #118 濃度に対応した標準曲線を作成することが可能です。
- 96 穴マイクロタイタープレートを利用しているため、多数のサンプルの同時測定が可能です。1 キットで最大 40 検体までアッセイできます（2 重測定の場合）。
- アイソトープを利用しない為、特殊な装置、設備は不要です。
- プレートはストリップタイプ（8 wells/strip）となっていますので、分割使用が可能です。
- 6.5～250 ng/ml のレンジで PCB #118 を測定することができます。
- 抗体の交差反応性を利用して、本キットによる測定値から試料中のおおよその PCB 総濃度を推定することが出来ます。

3. 測定原理(競合 EIA 法)

PCB #118 に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた競合 EIA 法です。

抗 PCB 抗体を固相化してある 96 穴マイクロタイタープレートのウェルに PCB 含有試料（DMSO 溶液）および HRP 標識競合体の混合液を添加し、競合反応させます。

洗浄後、HRP の基質であるテトラメチルベンジジン（TMB）を加え酵素反応を行い、反応液の吸光度を 450nm で測定します。この際、試料中の PCB 濃度が高くなるにつれ、抗体に結合できる HRP 標識競合体が少なくなるため、発色量が減少していきます。

実際の測定では、PCB を含んでいないブランク試料と測定試料との吸光度の比から、試料中の PCB 濃度を定量することが出来ます。